

Лабораторная работа №11

Тема: Экология микроорганизмов

Наименование работы: МЕТОДЫ УЧЕТА И АНАЛИЗА МИКРОФЛОРЫ ВОДЫ, ВОЗДУХА, ОБОРУДОВАНИЯ И ДРУГИХ ОБЪЕКТОВ, СВЯЗАННЫХ С ПРОИЗВОДСТВОМ ПИЩЕВЫХ ПРОДУКТОВ

Цель: Количественный учет бактерий в пробах. Микробиологическое исследование воды. Степень зараженности воды микроорганизмами имеет важное значение в технологии пищевого производства. Качество поступающей в производство воды должно полностью соответствовать ГОСТу и другим требованиям санитарного надзора. Возбудители многих пищевых кишечных заболеваний (бактерии дизентерии, брюшного тифа, паратифа и др.) выделяются больными и бактерионосителями вместе с фекалиями во внешнюю среду и, следовательно, могут попадать в открытые водоемы и водные источники. Непосредственное определение патогенных микробов в воде в условиях пищевых предприятий и лабораторий, во-первых, не допускается, во-вторых, методически затруднено, так как многие их виды не поддаются выращиванию на стандартных питательных средах. Поэтому в лабораторной практике присутствие этих микроорганизмов в воде обычно устанавливают косвенным путем, а именно: 1) определяют общее количество микроорганизмов в 1 мл воды; 2) определяют зараженность воды БГКП, так как последние являются специфическими представителями кишечной микрофлоры человека, где содержатся в огромных количествах (сотни миллионов на 1 г фекалий). Обнаружение в воде БГКП указывает на ее фекальное загрязнение и свидетельствует о возможном присутствии в воде возбудителей указанных выше кишечных заболеваний. Таким образом, БГКП выполняют роль санитарно-показательных микроорганизмов при определении доброкачественности питьевой воды, пищевых продуктов, санитарного состояния технологического оборудования. В стандартах предусмотрены предельно допустимые нормы содержания бактерий кишечной группы в воде и продуктах питания. БГКП объединяет группу сходных между собой бактерий: *Escherichia coli commune*, *Escherichia coli citrovomm*, *Escherichia coli aerogenes*, *Bad paracoli* и др. Основными морфологическими и физиологическими признаками этой группы являются следующие: 1) короткие бесспорные, грамтрицательные, в большинстве своем подвижные палочки; 2) аэробы и факультативные анаэробы; 3) сбраживают сахара: глюкозу, лактозу, маннит (в зависимости от разновидности) при температурах 43-45°C в течение 24 часов с образованием

кислоты и газа; 4) растут на фуксиносультитном агаре (среда Эндо) в виде темно-красных колоний с металлическим зеленовато-золотистым блеском или красных и розовых колоний с более темным центром. При санитарно-гигиенической оценке воды важно не только найти БГКП, но необходимо учесть и количество этих бактерий, что позволит судить о степени фекального загрязнения воды. Для учета в воде определяют титр кишечной палочки (colі - титр) и индекс (colі- индекс). Коли-титром называется наименьшее количество воды (в мл), в котором обнаружена хотя бы одна палочка БГКП, коли-индекс – это число палочек, найденных в одном литре исследуемой воды. По ГОСТу 2874 – 82 для питьевой воды, прошедшей очистку, коли-титр должен быть не ниже 300, коли-индекс - не более 3, общее количество микроорганизмов - не более 100 в 1 мл воды. Для определения общего количества микроорганизмов, в 1 мл. воды делают глубинный посев 1 мл исследуемой воды на 1 мясопептонный агар (МПА) в чашку Петри. Если вода сильно загрязнена, посев проводят с разведением (в зависимости от степени загрязненности). Методика посева с разведением описана в работе 6. Посевы воды выращивают в термостате при температуре 30-35°С в течение 24-18 ч., после чего подсчитывают количество колоний на чашке. Подсчет колоний и определение количества микроорганизмов в 1 мл проводится по методике также описанной в работе 6. Во принятым нормам считается, что хорошая питьевая вода содержит в 1мл до 100 микроорганизмов, сомнительная от 100 до 500 микроорганизмов, загрязненности выше 500 вода требует очистки. Для определения титра кишечной палочки в воде предложены методы бродильных проб, мембранных фильтров и других. Бродильный метод основан на способности БГКП сбраживать сахара с образованием газа и кислот в условиях повышенных температур (43°-45°С). Для посева воды используется жидкая среда Булира (мясная вода - 1 л, пептон – 10 г, маннит – 15г, NaCl – 5г, 1% водный раствор нейтральрот-2 мл, который добавляют после доведения рН среды до 7,0-7,2). Указанная среда разливается в пробирки с маленькими перевернутыми пробирочками (поплавками) и стерилизуется дробно или 30 мин. при 0,5 атм. в автоклаве. Для посева берут 1 мл. исследуемой воды, (методика посева с разведением описана в работе 6). Засеянные пробирки ставят на 45 часов в термостат при температуре 43°-45°С максимальной для БГКП, но угнетающей развитие большинства других сапрофитных микроорганизмов. При развитии БГКП на среде Булира отмечают следующее: 1) помутнение (развитие бактерий); 2) накопление газа в поплавках (сбраживание маната); 3) изменение окраски (кишечная палочка восстанавливает нейтральрот, благодаря чему красная окраска исчезает и

среда приобретает соломенно-желтый цвет). Если газа и мути нет, это указывает на отсутствие фекального загрязнения. Наличие газа и помутнения или только помутнения указывает на возможность присутствия БГКП. Посев на среду Эндо. В связи с тем, что в пробах исследуемой воды, а также а смывах с оборудования, сырья, полуфабрикатов, пищевых продуктов, рук работников и других объектов могут присутствовать различные бактерии, сбраживающие маннит с образованием газа, то для точного установления наличия БГКП из забродивших пробирок делают пересев на специфическую среду Эндо (способ приготовления указан на этикетки промышленно приготовленной сухой среды Эндо). Готовая среда в расплавленном состоянии имеет красноватый цвет, застывшая в чашках Петри – кремовый. Среда Эндо готовится на 2-3 суток. При более длительном хранении ее необходимо держать в холодильнике. Пересев со среды Булира на среду Эндо производят следующим образом: карандашом по стеклу размечают дно чашки на сектора по числу пробирок, в которых обнаружено помутнение и газообразование. Из каждой пробирки, захватив небольшое количество материала, делают высев с помощью петли в соответствующий сектор на чашку. Посев делают штрихом, проводя петлей зигзаг по поверхности агара для получения изолированных колоний. Чашки с посевом помещают в термостат при 37°C на 24 ч. По окончании срока выращивания колонии исследуют. При развитии на среде Эндо типичная кишечная палочка образует характерные колонии красного цвета с металлическим блеском, иногда темно-красные и розовые с темным центром. Если бродильная проба на среду Булира положительная и культура на среде Эндо имеет ярко-красные колонии, можно считать установленным присутствие в исследуемых пробах БГКП. Из типичных колоний следует приготовить мазки и окрасить их по Граму. Обнаружение в мазках грамотрицательных палочек подтверждают наличие бактерий кишечной группы. Задание 1. Определить общее количество микроорганизмов в 1 мл исследуемой воды (подсчет колоний на МПА). 2. Определение титра кишечной палочки в воде методом бродильных проб. Исследование микрофлоры воздуха Воздух не является благоприятной средой для развития микроорганизмов, однако количество их может быть значительно. Содержание микробов в воздухе помещений зависит от разнообразных причин и условий. Особенно сильно загрязняется воздух микроорганизмами при наличии пыли и большой скученности людей. На пищевых производствах приходится считаться с воздухом, как с фактором загрязнения полуфабрикатов и готовой продукции нежелательной микрофлорой. Для исследования загрязненности воздуха микроорганизмами предложено несколько методов. Наиболее простым является метод оседания

микроорганизмов на поверхность плотной питательной среды (седиментационный метод Коха). Для выполнения работы берут 2 стерильные чашки Петри, в одну из них наливают 10-15 мл мясопептонного агара, а в другую – соответствующее количество сушеного агара. После застывания среды чашки подсушивают в термостате для удаления с поверхности среды влаги. Закрытые чашки вносят в помещение, где исследуется воздух, ставят их на горизонтальную поверхность, снимают крышки и кладут одним краем на бумагу, а другим на край открытой чашки. Чашки оставляют открытыми на 5-10 минут. После выдержки чашки закрывают и ставят перевернутыми в термостат с МПА при температуре 37°C на 1-2 суток, а с сушеным агаром на 2-3 суток при 30°C. Количество выросших колоний характеризует загрязненность воздуха. Для пересчета количества микробов на 1 м³ воздуха пользуется формулой В.Л. Омелянского, согласно которой в течение 5 мин. на площадь 100 см² (плотной питательной среде) оседает столько микробов, сколько их содержится в 10 л воздуха (1/100 м³) при условии, если воздух находится в состоянии покоя. В зависимости от диаметра и площади чашек Петри были рассчитаны постоянные множители, на которые надо умножать число колоний, выросших на данной чашке. Диаметр чашки в см Площадь чашки в см² Множитель расчета числа микробов в 1 м³

8	50	100	9	63	80	10	78	60	11	95	50	2
113	45											

Например: если на чашке площадью 78 см² выросло 25 колоний, то количество микробов в 1 м³ = 25 × 60 = 1500. Полученные результаты характеризуют обсемененность выпадающих капельных частиц, находящихся в воздухе, что дает ориентировочное представление об общей обсемененности воздуха микроорганизмами. Но седиментационный метод удобен для практической работы. Им широко пользуются для выяснения степени загрязнения воздуха в разных помещениях, когда ставят задачи определения общего санитарного состояния или эффективности вентиляции и уборки помещения. Применяя специальные среды, этим методом можно определить обсемененность воздуха разными группами и видами микроорганизмов.

Задание 1. Провести посев воздуха в лаборатории и боксе методом оседания на МПА и СА. 2. Провести количественный (по формуле Омелянского) и качественный (микроскопированием) анализ микрофлоры воздуха указанных помещений. Санитарно-бактериологическое исследование оборудования, инвентаря, рук работающих и других объектов, связанных с производством пищевой продукции

Отбор проб для исследования микрофлоры оборудования проводится методом смыва тампоном смоченным стерильной водой с площади ограниченной рамкой-шаблоном. Рамка-шаблон изготовлен из проволоки.

Имеет площадь 100 см² (10 x 10). Перед взятием пробы-шаблон обжигают в пламени горелки. Ватный тампон смачивают водой из пробирки с 10 мл стерильной водой и, произведя смыв, опускают его в пробирку. Пробирку хорошо встряхивают и делают посев по 1 мл на МПА и в пробирки со средой Булира или Кесслера для выявления БГКП. Посевы выращивают при t° 37°C в течение 24 час. Учитывая число колоний на МПА делают пересчёт на 1 см² площади оборудования по формуле $M = n \cdot 10/s$, где M – общая бактериальная обсеменённость, n – количество колоний в 1 мл смыва, 10 – количество стерильной воды (мл), s - площадь с которой произведён смыв. Рассчитав общую обсеменённость объекта заполняют таблицу и делают вывод о его санитарном состоянии. Рамка-шаблон Оценка Общая обсеменённость КОЕ/см². Чистый до – 10 000 Умер. загрязн. 10000 – 100 000 Сильная загрязн. Более 100 000 Анализ микрофлоры рук. Для проверки личной гигиены обслуживающего персонала производят анализ рук на кишечную палочку и общее количество бактерий. При массовых анализах удобен следующий метод – через ватную пробку, вставленную в пробирку с 10 мл воды, пропускают палочку или толстую алюминиевую проволоку с ватным тампоном на конце и стерилизуют. Тампон не должен касаться воды .

Задание Сделать смыв с оборудования и рук. Сделать посевы смывов на МПА и среды для выявления БГКП. Провести подсчет и анализ микрофлоры.

Работа 9. ПРЕВРАЩЕНИЕ МИКРООРГАНИЗМАМИ БЕЗАЗОТИСТЫХ И АЗОТОСОДЕРЖАЩИХ ОРГАНИЧЕСКИХ ВЕЩЕСТВ (ПРОЦЕССЫ БРОЖЕНИЯ И ГНИЕНИЯ) Процессы брожения, вызываемые микроорганизмами, являются важнейшими звеньями превращения безазотистых органических веществ. Эти превращения очень сложны и разнообразны. Каждый вид брожения вызывается определенным видом (группой) микроорганизмов. Многие виды брожений широко используются в промышленности. С другой стороны, возбудители многих брожений вызывают порчу пищевых продуктов и напитков. Спиртовое брожение Одним из важнейших брожений в промышленности является спиртовое брожение углеводов, которое вызывается дрожжами, некоторых видов бактерий и муконовых грибов. Дрожжи рода *Saccharomyces* наиболее полно и быстро расщепляют сахар до конечных продуктов, вследствие чего имеют наиболее важное промышленное значение. Анаэробная природа спиртового брожения впервые была установлена Пастером. Ход брожения очень сложен, он состоит из нескольких этапов, в которых участвуют ферменты дрожжевой клетки. Суммарное уравнение спиртового брожения следующее: $C_6H_{12}O_6 = 2C_2H_5OH + 2CO_2 + 118 \text{ кДж}$ Способность дрожжей сбраживать сахар в течение определенного времени называется энергией брожения. Учет

энергии брожения проводится путем определен количества образовавшегося CO₂ и этилового спирта. Постановка опыта В качестве питательной среды для дрожжей используется среда следующего состава: сахароза - 15 г КН₂РО₄ - 0,3 пептон - 0,5 г MgSO₄ - 0,1г вода 100 мл Среду разливают по 100 мл в колбы, емкостью 250-300 мл и стерилизуют при 0,5 атм. 30 мин. Колбу - со 100 мл среды вносят немного (1 г) сухих прессованных дрожжей. Колбу закрывают каучуковой пробкой, в которую вставлен затвор Мейссля. Затвор устроен таким образом, что легко пропускает выделяющийся CO₂, но задерживает пары воды и спирта, которые; поглощаются налитой и в затвор крепкой серной кислотой. На затвор надевается небольшой кусок толстостенной каучуковой трубки, верхний конец которой крепко закрыт кусочком стеклянной палочки, а боковая стенка имеет небольшой продольный разрез. Колбы взвешивают на технических весах с точностью до 0,01 г и ставят в термостат при температуре 28°C на двое – трое суток.

Условия, способствующие развитию дрожжей, но препятствующие росту других микроорганизмов, будут следующие: 1. Высокая концентрация сахара (15%); 2. Кислая среда за счет КН₂РО₄ (рН=5,0); 3. Накопление значительного количества спирта; 4. Анаэробные условия. Сумма этих факторов делает среду селективной для культуры дрожжей. Исследование результата опыта на спиртовое брожение Конец брожения устанавливается по прекращению газообразования. По окончании опыта колбу снова взвешивают. Количество выделенной углекислоты в граммах определяют по разнице между начальной массой колбочки и ее конечной массой после брожения. Для определения энергии брожения используют суммарное уравнение спиртового брожения: $C_6H_{12}O_6 = 2C_2H_5OH + 2CO_2$
180 92 88 (молекулярный вес). Из этого уравнения следует, что на долю CO₂ приходится почти 50% сброженного сахара. Например, в нашем опыте среда содержит 15г сахара. Из этого количества может выделиться около 7-7,5г углекислоты. Зная количество выделившейся углекислоты, легко определить количество образовавшегося спирта и количество сброженного сахара (энергия брожения). Пример расчета Допустим, что потеря в весе колбочки (т.е. количество выделившегося CO₂) равна 7,0 г, тогда исходя из вышеуказанного уравнения, количество образовавшегося спирта будет равно: $92 - 88 \cdot \frac{7}{7} = 7,2$ г. спирта 88 Количество сброженного сахара соответственно будет равно: $180 - 88 \cdot \frac{7}{7} = 100$ г. 100 х = = 96% 15 Маслянокислое брожение Маслянокислое брожение представляет собой процесс анаэробного разложения углеводов, при котором образуется масляная кислота, CO₂, H₂ и др. побочные продукты. Суммарное уравнение маслянок. х = = 14,2 г.

сахара 88 Количество сброженного сахара = количеству образовавшегося спирта + количество выделившегося CO₂, т.е. $14,2 = 7,2 + 7$ г. Энергию брожения, выраженную в процентах сброженного сахара за определенный промежуток времени, вычисляют следующим образом: исходная среда содержала 15% сахарозы, эту величину принимают за 100, тогда из следующей пропорции $15 — 100$ получают показатель энергии брожения: $14,2 - x$ дрожжей: 14,2 ислого брожения: $C_6H_{12}O_6 = C_2H_5OH + 2CO_2 + 2H_2 + 72$ кДж

Возбудители этого процесса маслянокислые клостридии широко распространены в почвах, в придонных иловых отложениях и др. местах, где нет доступа воздуха. Маслянокислые клостридии представляют собой довольно крупные, подвижные палочки, грам +, образуют споры, превышающие диаметр клетки, строгие анаэробы, типовой вид *Clostridium butyricum*. Оптимальные t° развитие 35°-40°С, термоустойчивость спор -110°-115°С в течение 10-15 мин. В бродильной промышленности маслянокислое брожение приносит большой вред, т.к. масляная кислота угнетает спиртовое брожение и придаёт горький вкус и неприятный запах готовой продукции. Еще более опасным это брожение является для консервной промышленности, где в результате брожения возникает бомбаж банок и резкое прогоркание продуктов. Постановка опыта на маслянокислое брожение (на картофеле) Неочищенный сырой картофель нарезают мелкими кусочками, заполняют им 1/4 объема высокой пробирки, заливают водопроводной водой на 2/3 объема пробирки, добавляют немного мела, для нейтрализации образующейся масляной кислоты, и ставят в водяную баню с t° = 80°С на 10-15 мин. (пастеризация). После этого пробирки охлаждают под краном и ставят в термостат при t=35°С на 2-3 сут. При развитии маслянокислого брожения картофель всплывает, на поверхности наблюдается обильное газообразование. Препарат готовят непосредственно из пробирки, для чего берут петлей каплю жидкости со дна пробирки, наносят на предметное стекло, подкрашивают раствором Люголя и накрывают покровным стеклом. Смотрят с иммерсией. При микроскопировании обнаруживаются крупные подвижные палочки с утолщенными концами или с утолщением в середине клеток (клостридии). В местах утолщения заметны овальные тельца, сильно преломляющие свет - споры. Аммонификация или гниение белковых веществ Гниением или аммонификацией называется процесс разложения белковых веществ. Эти вещества гидролизуются до аминокислот под действием протеолитических ферментов. Промежуточными продуктами белкового распада является летучие жирные кислоты, спирты, индол, скатол и др. Конечными продуктами: аммиак (NH₃), сероводород (H₂S), CO₂, H₂O. Процесс гниения

может протекать как в аэробных, так и анаэробных условиях. При этом участвуют разные группы микроорганизмов, но главным образом многочисленные виды гнилостных бактерий и бацилл. Постановка опыта Для культивирования аммонифицирующих бактерий можно пользоваться разными средами, содержащими белковые вещества, например, МПБ. Для анализа берут пробирку с 10 мл МПБ, заражают небольшим комочком почвы. Пробирки закрывают ватными пробками, под которые подвешивают смоченную дистиллированной водой красную лакмусовую бумажку (для обнаружения выделяющегося аммиака) и полоску фильтрованной бумаги смоченной раствором уксуснокислого свинца (для выявления сероводорода). Пробирки покрывают сверху пергаментной бумагой и помещают в термостат при $t = 25^{\circ} - 30^{\circ}\text{C}$ на 2-3 суток. При исследовании результатов опыта обнаруживается: а) проба на аммиак - красная лакмусовая бумажка становится синей (подщелачивание среды) б) проба на сероводород - белая фильтровальная бумажка смоченная уксуснокислым свинцом чернеет в присутствии H_2S . При рассматривании препарата в раздавленной капле наиболее часто обнаруживаются подвижные бесспорные палочки *Bacterium proteus*, и спорообразующие клостридии типа *Clostridium putrificum* и др.

ПРИЛОЖЕНИЕ Питательные среды Используемые при исследовании микрофлоры сырья, полуфабрикатов, готовой продукции, а также других объектов, связанных с производством пищевых продуктов. Среды для бактерий

Среды для определения кишечной палочки. Среда Булира. На 1 л. мясопептонного бульона с нейтральной или слабощелочной реакцией (рН 7,0 - 7,2) прибавляют 10 г маннита или молочного сахара, бульон нагревают до полного растворения внесенных углеводов, фильтруют, прибавляют к фильтрату 6 мл 1%-ного раствора нейтральрота, разливают по пробиркам, в которые бросают кверху дном маленькие пробирочки (поплавки) стерилизуют при 1 атм. 10 мин. (вишнево-красный цвет). Среда Кесслера (модифицированная). К 1л водопроводной воды прибавляют 50 мл свежей бычей желчи или желчи других сельскохозяйственных животных и 10г пептона, смесь кипятят 20-30 мин. на водяной бане при помешивании. Когда пептон растворится, фильтруют через вату, затем прибавляют 2,5г глюкозы. По растворению устанавливают щелочную реакцию по лакмусу или слабощелочную по фенолфталеину (рН 7,6) и добавляют 2 мл 1%-ного водного раствора генцианвиолета. Среду разливают по пробиркам с бродильными пробирочками и стерилизуют при 1 атм. 15 мин. Агар с мелом (для молочнокислых бактерий). Для лучшего распознавания колоний молочнокислых бактерий к питательному агару (сывороточному, из гидрализованного молока и т.п.) перед стерилизацией прибавляют мел (от 2-

3%). Выросшие колонии молочнокислых микробов устанавливают по прозрачным зонам вокруг них (работа 7). Среды для анаэробов Среда Китта-ТароцЦН. В высокую пробирку с нейтральным МПБ вносят кусочки сваренной и промытой кипящей водой на сите печени (3-5 г на пробирку) или мясной фарш. Заливают на 2/3 уровня пробирки. Сверху среду покрывают тонким слоем вазелинового масла и стерилизуют при 120°C в течение 30 мин. Перед посевом пробирку прогревают в кипящей водяной бане в течение 15-20 мин. (для удаления воздуха) и быстро охлаждают. Для стафилококков (*Staphylococcus aureus*) Кровяной МПА. К расплавленному и охлажденному до 50°C мясопептонному агару стерильно добавляют 5-10% дефибринированной крови, перемешивают и разливают по бактериологическим чашкам (чашкам Петри). Чашки с агаром ставят в термостат при $t = 37^{\circ}\text{C}$ на сутки для проверки стерильности среды. Желточно-солевой агар 40 г. сухого МПА, NaCl - 90 г на 1000 мл воды варить 3 минуты, после чего охладить до комнатной температуры. 2 яичных желтка размешать в 100 мл физиологического раствора. Все смешивают и используют для выявления токсигенных стафилококков (работа 7). Среда для обнаружения термофилов Глюкозопептонный агар с бромкрезол пурпуром. Состав: пептон-10 г, глюкоза-5 г, агар-15 г, бромкрезол пурпур-0,04 г, вода-1000 мл. Стерилизуют атм. 0,5 в течение 30 мин. Посевы выращивают при 55°-60° С в течение 48 часов. При развитии на сред колоний термофилов возбудителей плоского скисания вокруг каждой образуется на пурпурном фоне жёлтый ореол, вследствие взаимодействия образующейся кислоты с индикатором. Среда для выделения слизиобразующих бактерий. Приготовить МПА+10% сахарозы. Среды для грибов Агар Чапека (ЧА) Для культивирования мицелиальных грибов кроме сусло-агара в практике широко используются синтетические среды, в частности агар Чапека в составе: азотнокислого натрия (NaNO_3)-3 г, фосфорнокислого калия (KH_2PO_4) - 1 г, сернокислого магния (MgSO_4)-0,5 г, хлористого калия (KCl)-0,5 г, сернокислого железа (FeS)- 0,01 г, сахарозы-30 г, воды дистиллированной-1000 мл. После растворения указанных веществ прибавляют в раствор 2,5% агара для получения плотной среды и стерилизуют в автоклаве при 0,5 атм. в течение 20 мин или дробной стерилизацией. Дрожжевая вода 80 г прессованных дрожжей разводят в 1 л водопроводной воды. Кипятят 20 мин, затем фильтруют через бумажный фильтр, разливают в посуду и стерилизуют 20 мин при 1 атм. (пересованные дрожжи можно заменить сухими из расчёта 20 г на 1 л). При приготовлении дрожжевой воды с сахаром к готовой среде добавляют 2% глюкозы или сахарозы и стерилизуют 20 мин. при 0,5 атм. Среда Сабуро К 100 мл дрожжевой стерильной воды добавляют 5 г пептона,

4 г глюкозы, 1,8 г агара. Стерилизуют 30 мин. при 0,5 атм.

ЛИТЕРАТУРА Гигиенические требования к качеству и безопасности продовольственного сырья и пищевых продуктов. СанПиН 2.3.2 560-96 М. 1997. ГОСТ 30425-97 Консервы. Методы определения промышленной стерильности. Сборник М.: Изд. Стандартов, 1998 г. ГОСТ 9225-84 Молоко и молочные продукты. Методы микробиологического анализа. Жарикова Г.Г., Козьмина А.О. Микробиология санитария и гигиена пищевых продуктов. Гелан, Москва, 2001 г. 247 с. Бабьева И.П., Голубев В.И. Методы выделения и идентификация дрожжей. М.: Пищепромиздат, 1997, 120 с. Теппер Е.З., Шильникова В.К. Практикум по микробиологии. М.: Колос, 1979, 216с. Смирнова Т.А., Кострова Е.И. Микробиология зерна и продуктов его переработки. М.: ВО Агропромиздат, 1989, 157 с. Техническая микробиология рыбных продуктов. М.: Пищевая промышленность, 1976, 266с. 9. Панов В.П., Кострова Е.И., Кондратьева С.М. «Техническая микробиология пищевых продуктов». Курс лекций. М.: 1998 г., 112 с. Выписка из протокола №7 от 13.06.02.г.